

(54) **FOOD CONTAINING AQUEOUS SOLVENT EXTRACT OF "SAKE" BREWING LEE**

(11) 63-44878 (A) (43) 25.2.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-188825 (22) 12.8.1986
 (71) AKIO FUJIKAWA (72) AKIO FUJIKAWA
 (51) Int. Cl. C12F3 00, C12G3 02

PURPOSE: To produce a food having effect on promotion of metabolism of body fat and maintenance of health, by adding any one of aqueous solvent extract of SAKE brewing lees, concentrate thereof and dried flour of the extract to a food.

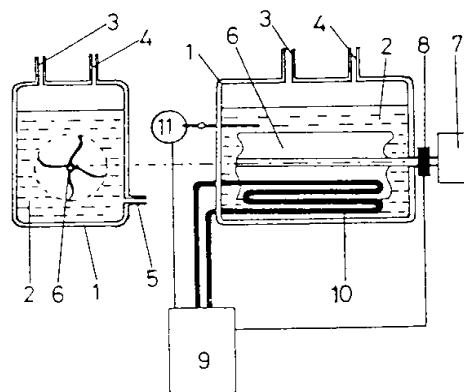
CONSTITUTION: SAKE brewing lees, e.g. refined SAKE lees, beer cake, etc., are thoroughly dispersed, heated at about 40°C, allowed to stand overnight, heated at about 110°C and dried. An aqueous solvent, e.g. water, dilute saline solution, dilute organic acid, dilute aqueous ethanol, etc., is added to extract the resultant dried brewing lees and the resultant extract is filtered to give an extract. The resultant extract is directly used or concentrated or any form of the dried powder thereof is used as an edible form, e.g. drink, jelly, confectionery, tea, sprinklings, etc.

(54) **AUTOMATIC AGING ACCELERATION APPARATUS FOR ALCOHOLIC BEVERAGE**

(11) 63-44879 (A) (43) 25.2.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-188383 (22) 13.8.1986
 (71) KATSUO EBARA (72) KATSUO EBARA
 (51) Int. Cl. C12H1/00, C12G3/02

PURPOSE: To make it possible to automatically and readily carry out aging of an alcoholic beverage consisting essentially of ethanol and water, by cooling the alcoholic beverage at such a low temperature as not to coagulate.

CONSTITUTION: An alcoholic beverage consisting of ethanol and water is cooled to $\leq 0^{\circ}\text{C}$ at a low temperature not to coagulate and aged. For example, an alcoholic beverage 2 is introduced from a sample injection port 3 into a low-temperature bath 1. Nitrogen gas is fed from an inlet port 4 thereinto for preventing air oxidation of the alcoholic beverage and kept in a specific pressurized state. Rotating blades 6 connected to an agitator 7 are rotated to keep the sample in the bath at a constant temperature. Furthermore, a torque meter 8 connected to the shaft of an agitating motor for measuring viscosity is provided. The sample is directly cooled with a circulating pipe 10. The alcoholic beverage can be automatically kept at a low temperature or treated at a temperature just before the freezing point and aging can be promoted regardless of the alcoholic concentration by the above-mentioned construction.

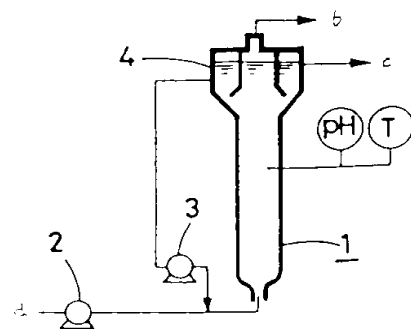


(54) **NOVEL FLOCCULATING YEAST, PRODUCTION THEREOF AND ALCOHOLIC FERMENTATION METHOD USING SAID YEAST**

(11) 63-44880 (A) (43) 25.2.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-190318 (22) 12.8.1986
 (71) HITACHI ZOSEN CORP (72) TOMOTAKA HISAYASU(3)
 (51) Int. Cl. C12N1/16, C12P7/06, (C12P7/06, C12R1/85)

PURPOSE: To obtain a yeast of the genus *Saccharomyces* and carry out alcoholic fermentation with improved ethanol productivity using said yeast, by subjecting different auxotrophic strains of yeast of the genus *Saccharomyces* to protoplast fusion.

CONSTITUTION: An auxotrophic stain of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* IFO-1953 and auxotrophic strain of a yeast *Saccharomyces* S₁ (FERM-P No.7794) are subjected to protoplast fusion, the resultant yeast *Saccharomyces* S₁ × 1953-AA (FERM P.No.8895) has improved flocculation degree of 5 expressed in terms of DF value. The alcoholic fermentation is carried out by putting a preculture fluid of the above-mentioned yeast in a fermenter 1 containing a raw material by using an apparatus shown in the figure according to batch cultivation. When the culture medium is then continuously fed to perform alcoholic fermentation, flocks, are formed in the fermenter 1 by improved flocculation property of this yeast to afford the aimed high-concentration alcohol.



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-44880

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)2月25日

C 12 N 1/16

G-6712-4B

C 12 P 7/06

K-6712-4B

//(C 12 P 7/06

7236-4B

C 12 R 1:85)

審査請求 未請求 発明の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 新規凝集性酵母、その製造法およびこれを用いるアルコール発酵法

⑯ 特 願 昭61-190318

⑰ 出 願 昭61(1986)8月12日

⑱ 発 明 者 久 安 智 香 大阪府大阪市西区江戸堀1丁目6番14号 日立造船株式会社内
⑱ 発 明 者 浅 野 慎 一 大阪府大阪市西区江戸堀1丁目6番14号 日立造船株式会社内
⑱ 発 明 者 山 抱 基 純 大阪府大阪市西区江戸堀1丁目6番14号 日立造船株式会社内
⑱ 発 明 者 木 田 建 次 大阪府大阪市西区江戸堀1丁目6番14号 日立造船株式会社内
⑲ 出 願 人 日立造船株式会社 大阪府大阪市西区江戸堀1丁目6番14号
⑲ 代 理 人 弁理士 岸本 瑛之助 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

新規凝集性酵母、その製造法およびこれを用いるアルコール発酵法

2. 特許請求の範囲

- (1) 優れた凝集性を有する酵母サッカロマイセス (*Saccharomyces*) S₁ × 1953-AA (微工研菌第8895号)。
- (2) 凝集性がDF値で表わして5である特許請求の範囲第1項記載の酵母。
- (3) 酵母サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) JFO-1953の栄養要求性株と酵母サッカロマイセス (*Saccharomyces*) (FR_{H17} V_{H2}-1) S₁ (微工研菌第7794号)の栄養要求性株とをプロトプラスト融合させ、得られた融合菌体を培養し、優れた凝集性を有する酵母サッカロマイセス (*Saccharomyces*) S₁ × 1953-AA (微工研菌第8895号)を得ることを特徴とする凝集性酵母の製造法。

- (4) 優れた凝集性を有する酵母サッカロマイセス (*Saccharomyces*) S₁ × 1953-AA (微工研菌第8895号)を用いることを特徴とするアルコール発酵法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、優れた凝集性を有する新規酵母、その製造法およびこれを用いるアルコール発酵法に関するものである。

発明の背景

近年、石油代替エネルギーとして、石油化学によらずに得られる発酵アルコールが注目されている。これはさとうきびやこれから採った甜菜、さらにはさつまいも、じゃがいも、とうもろこしなどのでん粉質またはセルロース質を原料とし、これらを微生物の働きによって発酵させることにより製造される。

一般にアルコール発酵では、アルコールの生産性は発酵槽内の菌体濃度に比例する。そこで発酵槽内の菌体濃度を高める手段として、優れ

た凝集性を有する酵母を用いることが考えられる。すなわち、酵母が優れた凝集性を有していると、酵母の沈降速度が速くなり、そのため固液分離が迅速かつ容易になし得る。そして例えば固分発酵においては、発酵液を単に静置するだけで菌体を沈降凝集させることができ、発酵液と菌体の分離を容易に行なって菌体を再使用に供することができる。また連続発酵においては、小径の流動部とこれの上に連続された菌体沈降用の大径の沈降部とこれに内装された菌体沈降部材とを主体とした塔型発酵槽を用いることにより、培地の供給量が增大しても菌体を沈降させてその流出を防止することができる。このように凝集性を有する酵母を用いると、凝集性を有しない酵母を用いた場合に比べて多くの利点があり、そのため新規凝集性酵母が要望されている。

従来技術およびその問題点

従来から、上記の要望にこたえるべく、凝集性酵母を取得する試みがなされて来たが、従来

の酵母は自然界から得られた野生株であって、たとえば土壌を採集し特定の土壌から分離したものであった。

しかしこのように自然界から所望の菌株を見つけ出して分離する作業は、はなはだ煩わしいものであり、また所望の菌株を採取できる確実性の乏しいものであった。

本発明は上記のような実情からなされたものであって、優れた凝集性を有しかつ実験室で得ることのできる新規凝集性酵母を提供することを目指す。

本発明者らは、先に、鹿嶋宮によく成育できる酵母から変異処理およびプロトプラスト融合法により、優れた凝集性を有しかつアルコール発酵能を有する酵母(FRH17 V_{H2}-1)S₁を造成した。しかしこの酵母を用いて連続発酵を行ない、希釈率Dを上げていくと、D=0.5 h⁻¹でやや凝集性が弱くなるさらいがあった。そこで著しい凝集性を有するタイプ・カルチャーである酵母IFO-1953と上記酵母(

- 3 -

FRH17 V_{H2}-1)S₁とのプロトプラスト融合を行なったところ、優れた凝集性と高いエタノール生産性を有する新規株を取得し、発明を完成するに至った。

問題点を解決するための手段

本発明の第1のものは新規酵母すなわち優れた凝集性を有する酵母サッカロマイセス(*Saccharomyces*)S₁×1953-AA(微工研菌寄第8895号)それ自体であり、また第2の発明は本発明の酵母S₁×1953-AAの製造法であり、さらに第3の発明は本発明の酵母S₁×1953-AAを用いるアルコール発酵法である。

まず本発明の酵母S₁×1953-AAそれ自体について説明する。

本明細書において、酵母の凝集性の程度(Degree of flocculation)は、以下に示すギリランド・テスト(Gilliland test)(European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 第7巻、第227-23

- 4 -

4頁、1979年)により求められたDF値で表示される。すなわち供試菌株をYPD培地(注1)で30℃で16時間振盪培養した後、菌体の沈降速度、沈降菌体の容量および硬さを肉眼観察により対照菌株と比較し、表1に示すDF値0から5の6段階で凝集の程度を表示する。

(以下余白)

- 5 -

- 6 -

表 1

DF値	凝集状態
5	沈降速度が早く、沈降固体の容積が多く、極めて著しい凝集性を示す
4	著しく凝集する
3	中程度の凝集性を示す
2	わずかに凝集する
1	非常にわずかに凝集する
0	培養液が均一で凝集性を全く示さない

本発明の酵母S: ×1953-AAは下記の菌学的性質を有する。すなわちこの酵母は、

- ・DF値5なる凝集性を有し、液体培養では著しい沈降性を示す。
- ・乳糖液(たとえば15%の全糖分を含む乳糖液)を発酵し、7~9 vol %のエタノールを生成する。
- ・寒天平板上で多少硬い集落を形成する。
- ・胞子形成能を有する。

- 7 -

表 2

		有(+) 無(-)
発酵性	グルコース	+
	ガラクトース	+
	シュクロース	+
	マルトース	+
	ラクトース	-
	ラフィノース	-
質化性	グルコース	+
	ガラクトース	+
	シュクロース	+
	マルトース	+
	ラクトース	-
	エタノール	±
	KNO ₃	-
アルブチン分解能		-
ビタミン要求性		+
備 考: 球形ないし卵形の細胞		

- 9 -

本発明の酵母S: ×1953-AAはまた下記表2に示すとき菌性質(発酵性および質化性の有無、生理的性質)を有する。

(以下余白)

- 8 -

なお、サッカロマイセス(Saccharomyces)属に属する酵母は下記のような菌学的性質を有することが知られており(J. Lodder著「The Yeasts, A Taxonomic Study」第2版、North-Holland Publishing社発行、1970年)、本発明の酵母もこれらの性質を有する。

すなわち、この属に属する酵母は、

- ・多嚢出芽によって増殖する。
- ・子のう胞子を形成する。
- ・硝酸塩を質化しない。
- ・真菌糸を欠くかまたはわずかししか形成しない。
- ・成熟子のうは容易に開裂しない。
- ・胞子の形状は球形ないし卵形である。
- ・グルコースをよく発酵する。
- ・麦芽汁培地に皮膜を形成しない。

本発明の酵母の培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要ならば有機微量栄養素を含有する通常の培地が使用できる。炭素源としてはグルコース、ガラクトース、フラクトース、シュクロース、スターチ加水分解物、

- 10 -

果汁、セルロース分解物などの炭水化物がよく用いられる。前培養培地としては、酵母エキス10、ポリペプトン20、グルコース20、無菌水100よりなる培地がよく用いられる。この培地のpHは無調整で5.5である。

培養は温度25~40℃好ましくは30~37℃で、pH3.0~7.0好ましくはpH3.5~6.0で行なわれる。

つぎに、本発明の酵母の製造法について説明する。

本発明の酵母は、酵母サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) IFO-1953の栄養要求性株(以下、これを酵母HZ-1953という)と酵母サッカロマイセス (*Saccharomyces*) (FR_{H17} V_{H2}-1) S₁ (微工研菌寄第7794号)の栄養要求性株(以下、これを酵母S₁という)とをプロトプラスト融合させ、得られた融合菌体を培養することにより製造される。

酵母HZ-1953および酵母S₁はいずれ

もDF値5の凝集性を有する。

プロトプラスト融合は常法によって行なわれる。通常は細胞数 $10^7 \sim 10^8$ 個/μlの濃度の各菌体懸濁液を調製し、これら懸濁液を好ましくは等量混合した後、酵母細胞壁溶解酵素を含むプロトプラスト調製液で混合物を処理するか、または各菌体懸濁液を同調製液で処理した後これらを混合する。

酵母HZ-1953および酵母S₁は、後述する実施例で実証されたように、それぞれ酵母IFO-1953および酵母(FR_{H17} V_{H2}-1) S₁を胞子形成処理し、得られた胞子を変異処理し、得られた変異胞子を培養することにより、再現性よく取得せられる。

胞子形成処理は常法に従ってなされる。通常は酵母をYPD寒天培地(注2)で培養した後、胞子形成寒天培地(注3)に塗抹する方法がとられる。また単独胞子由来の菌落を得るには、酵母細胞壁溶解用の溶菌酵素を用いて子のを溶解した後、マイクロマニピュレータを用いて

- 11 -

胞子を分離する方法、または同じく溶菌酵素で子のを溶解した後、超音波処理により胞子を分散させ、胞子を栄養寒天培地で培養する方法がとられる。

変異処理は、胞子形成処理により得られた胞子または子のに公知の突然変異処理、たとえば紫外線、X線、γ線を照射する物理的方法、エチルメタンスルホネート、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、4-ニトロキノリン-N-オキシドなどの変異誘起剤を接触した後に選択培地に生育する化学的方法のいずれによっても行なわれるが、エチルメタンスルホネートを用いる方法が特に好ましい。

上記一連の製造過程において、培地および培養条件は、前述した酵母自体の培地および培養条件と同じである。

つぎに本発明の酵母の原料酵母の製造法について説明する。

(FR_{H17} V_{H2}-1) S₁は、酵母サッカロマイセス (*Saccharomyces*) FR_{H17} V_{H2}-1

- 12 -

(微工研菌寄第7792号)を胞子形成処理し、得られた胞子を培養することにより製造される。この胞子形成処理も前述と同じ手法で行なわれる。

酵母FR_{H17} V_{H2}-1は、凝集性を有する酵母サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) RM-17 (微工研菌寄第7770号)と、凝集性を有しない酵母サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) VM-2 (微工研菌寄第7788号)とをプロトプラスト融合処理し、得られた融合菌体を培養しすることにより製造される。このプロトプラスト融合も前述と同じ手法で行なわれる。

酵母RM-17は、財団法人発酵研究所の保存菌である酵母サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) IFO-0224を胞子形成処理し、得られた胞子を変異処理し、変異胞子を培養することにより製造され、また酵母VM-2は凝集性を有しない酵母サッ

- 13 -

- 14 -

カロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) EY-1 (特開昭63-7793号) をやはり胞子形成処理し、得られた胞子を変異処理し、変異胞子を培養することにより製造される。この胞子形成処理および変異処理も前述と同じ手法で行なわれる。

発明の効果

この発明は以上のとおり構成されているので、本発明の発酵性酵母を用いてアルコール発酵を行なうことにより、固分発酵においても連続発酵においてもアルコール発酵槽内の菌体濃度を高く維持して、エタノールの生産性を大幅に向上することができる。

実施例

つぎにこの発明について当業者が再現できるように説明する。

I 製造例

(a) 酵母S₁の調製

高発性を有する (FR_{H17} V_{H2}-1) S₁ を YPD寒天培地 (注2) で温度30℃で24時

間培養し、ついでこれを胞子形成用寒天培地 (注3) に塗抹し、温度30℃で3~5日間培養を行なった。こうして胞子を形成した。

ついで胞子数が10⁷個/μlになるように、子のうを無菌水1μlに懸濁させ、集菌後リン酸緩衝液 (注4) で洗浄した。ついで子のうを相同酵素溶液 (注5) 2μl中で30℃で1時間振盪して、子のうを溶解させた。ついで集菌後、遊離した胞子を無菌水1μlで洗浄してリン酸緩衝液3μlに懸濁させた。

この懸濁液に変異誘起剤としてエチルメタンスルホネートを0.1μl添加し、懸濁液を30℃で2時間振盪した。こうして胞子を変異処理した。ついで集菌後、変異胞子をリン酸緩衝液0.2μlに懸濁させ、懸濁液に5%チオ硫酸ナトリウム水溶液3μlを添加して、懸濁液を30℃で10分間振盪した。こうして変異誘起剤を中和した。

集菌後、変異胞子をリン酸緩衝液1μlで2回洗浄して同緩衝液5μlに懸濁させ、懸濁液を氷

- 15 -

冷下に3分間超音波処理することにより変異胞子を懸濁液中に分散させた。ついで集菌後、懸濁液を無菌水で濃度1/10⁵~1/10⁶に希釈し、希釈懸濁液0.1μlをYPD寒天培地 (注2) に塗抹して30℃で48時間培養し、単独胞子由来の集落を得た。

こうして得られた集落のプレートマスタープレートとしてレプリカ法により変異株の検出を行なった。すなわち、融菌したベルベット布地を用いて、前記マスタープレートの集落を最小培地 (注6) にレプリカし、同培地で30℃で4日間培養し、最小培地で増殖できない菌株を高発要求性変異株としてマスタープレートから約菌した。

その結果、高発要求性株S₁を得た。得られた酵母S₁の高発性は (FR_{H17} V_{H2}-1) S₁のそれに比べて低下していなかった。

(b) 酵母HZ-1953の調製

高発性を有するIFO-1953を、酵母S₁の調製の場合と同じ手法で胞子形成および変

- 16 -

異処理し、高発要求性株HZ-1953を得た。
(c) 酵母S₁と酵母HZ-1953のプロトプラスト融合

酵母S₁をYPD培地10μlで30℃で16時間振盪培養し、集菌後無菌水1μlで洗浄した。ついでこれをプロトプラスト調製液 (注7) の2μlに懸濁させ、懸濁液を30℃で1時間振盪し、集菌後等張液 (注8) 1μlで2回洗浄を行なった。

酵母HZ-1953についても上記と同じ操作で処理を行なった。

ついでこうして得られた酵母S₁の処理菌体と酵母HZ-1953の処理菌体とを同濃 (懸濁液10⁸個/μlずつ) とって混合し、集菌後混合物を等張液0.1μlに懸濁させ、懸濁液にポリエチレングリコール水溶液 (注9) 2μlを添加した。この懸濁液を30℃で15分間静置してプロトプラスト融合を完結した。ついで集菌後、菌体を等張液1μlに懸濁し、懸濁液を20℃で15分間静置した。ついで懸濁液を等張液で希

- 17 -

- 18 -

度 $1/10 \sim 1/10^2$ に希釈し、希釈懸濁液を最小培地(注6)に塗抹し、菌圃用培地(注10)を接種した。この状態で30℃で4日間培養を行ない、凝集性(DF値=5)を有する融合株を分離し、この株を酵母 $S_1 \times 1953$ -Aとした。

なお、プロトプラスト融合に用いた両菌株 S_1 とHZ-1953は上記最小培地に生育できなかった。

(d) 酵母 $S_1 \times 1953$ -A株の発酵産物地での培養

融合株である $S_1 \times 1953$ -A株をYPD培地100mlで温度30℃で16時間振盪培養し、前培養液を得た。ついでフィリピン産発酵液418g/lに硫酸アンモニウム4.18g/lとピロ亜硫酸カリウム0.2g/lとを混合溶解しさらに硫酸でpH4.5に調整して得た培地1lに、前記前培養液を接種した。これを24時間攪拌培養した後、5分間静置し、300mlを残して培養液を引き抜き、新しい培地

を加えて1lとし、培養を再開した。こうして10回四分培養を繰り返した後、得られた酵母を $S_1 \times 1953$ -AA(特開昭63-8895号)とした。

II 凝集性およびアルコール発酵能の測定

酵母IFO-1953、FR_{H17} V_{H2}-1) S_1 、 S_1 および $S_1 \times 1953$ -AAについて、それぞれ凝集性の程度を示すDF値およびアルコール発酵能を測定した。

DF値は前述した方法で求めた。

またアルコール発酵能は下記の方法で求めた。すなわちフィリピン産発酵液475g/lに硫酸アンモニウム4.75g/lとピロ亜硫酸カリウム0.2g/lとを混合溶解した後、硫酸でpHを4.5に調整して得た培地1lに、前培養液を加え、これをミニジャー・ファーマンター(東京理科学器械社製M-100型)で温度35℃で回分培養を行ない、144時間後のエタノール生成量をガスクロマトグラフィーにより測定した。

- 19 -

測定結果は下記表3のとおりである。

- 20 -

表 3

酵 母	DF値	エタノール濃度(g/l)
IFO-1953	5	81
(FR _{H17} V _{H2} -1) S_1	5	90
S_1	5	63
$S_1 \times 1953$ -AA	5	95

- 21 -

- 22 -

II 使用例(アルコール連続発酵)

酵母S₁×1953-AAを用いてつぎの操作によりアルコール連続発酵を行ない、そのアルコール発酵能を調べた。

発酵装置として、第1図に示すアルコール発酵装置を用いた。これは実容積700mlのガラス製流動型発酵槽(1)を主体とし、温度制御およびpH制御できるように構成されている。そして発酵原料はポンプ(2)によって同槽(1)の底部に供給され、反応液はポンプ(3)で同槽の頂部から底部に戻され、槽頂の菌体沈降部(4)から流出するようになっている。

500ml坂口フラスコにおいてYPD培地(注1)100mlを調整し、これを温度121℃で10分間殺菌した後、YPD寒天斜面培地(注2)に保存した酵母S₁×1953-AA株を1白濁耳接種し、30℃で1夜培養した。こうして活性な酵母S₁×1953-AAの前培養液を得た。

フィリピン産腐敗菌培地(注11)600mlが

入っている発酵槽(1)に上記前培養液100mlを入れ、発酵温度30℃で8時間回分培養を行なった。ついで連続発酵用腐敗菌培地(注12)を水道水で希釈し、希釈液を発酵槽(1)に流量35ml/時(希釈率=0.05時⁻¹)で連続的に供給し、培地の供給量を徐々に増加していった連続発酵を行なった。

その結果、培地供給量を350ml/時(希釈率=0.25時⁻¹)に増加しても、本酵母の優れた凝集性により、槽内に直径1~4mmのフロックが形成された。また産生アルコールは6.4g/lという高い濃度で得られ、アルコール生産性(注13)は第2図に示すように希釈率0.5/時で32g/l・時という高い値に達した。

IV 比較例

酵母としてS₁×1953-AAの代わりに前記酵母EY-1を用い、その他の事項を上記使用例と同じにして、上記操作を繰返した。

その結果、培地供給量が70ml/時(希釈率=0.1時⁻¹)を超えると、アルコール生産性

- 23 -

(注13)は第2図に示すように4g/l・時から急激に低下した。

V 培地および試薬

培地および試薬はそれぞれつぎのとおりである。

(注1) YPD培地

酵母エキス	10g/l
ポリバブトン	20g/l
グルコース	20g/l

(注2) YPD寒天培地

酵母エキス	10g/l
ポリバブトン	20g/l
グルコース	20g/l
寒天	20g/l

(注3) 菌子形成用培地

硝酸ナトリウム	5g/l
寒天	20g/l

(注4) リン酸緩衝液

0.1Mリン酸緩衝液	
pH=7.5	

- 25 -

- 24 -

(注5) 腐敗酵素溶液

0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)にザイモリアーゼ20T(生化学工業社製)を0.05%溶かした溶液2mlと、2-メルカプトエタノール1.4μlとの混合液

(注6) 最小培地

Difco-Yeast Nitrogen Base W/O	
Amino acid(Difco社製)	6.7g/l
グルコース	20g/l
寒天	20g/l

(注7) プロトプラスト調製液

1.5M塩化カリウム0.8mlと、2/15Mリン酸緩衝液(pH7.5)1.0mlと、2-メルカプトエタノール1.4μlと、ザイモリアーゼ20T(生化学工業社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に0.25%溶かした溶液0.2mlとの混合液

(注8) 培養液

- 26 -

0.6M 塩化カリウム水溶液
 (注9) ポリエチレングリコール水溶液
 塩化カルシウム 5.6 g/l
 ポリエチレングリコール
 (PEG-6000) 300 g/l

(注10) 養菌用培地
 グルコース 20 g/l
 Difco-Yeast Nitrogen Base W/O
 Amino acid(Difco社製) 6.7 g/l
 Difco-Bact Agar(Difco 社製)
 30 g/l

(注11) フィリピン産菌培養培地
 フィリピン産菌培養 190 g/l
 硫酸アンモニウム 1.9 g/l
 ピロ亜硫酸カリウム 0.2 g/l
 調剤剤 0.5 g/l
 よりなる混合液を硫酸で pH4.5 に調整したもの

(注12) 連続発酵用菌培養培地
 フィリピン産菌培養 700 g/l

硫酸アンモニウム 3.5 g/l
 ピロ亜硫酸カリウム 1.2 g/l
 調剤剤 1.0 g/l
 よりなる混合液を硫酸で pH4.5 に調整したもの

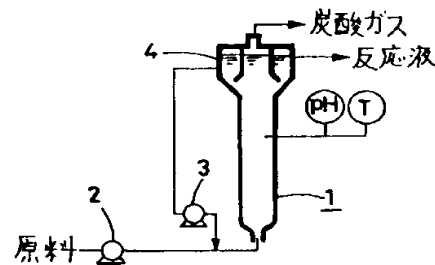
(注13) アルコール生産性
 培養液 1 l 当り 1 時間に生産されるアルコールの重量 (g)

4. 図面の簡単な説明

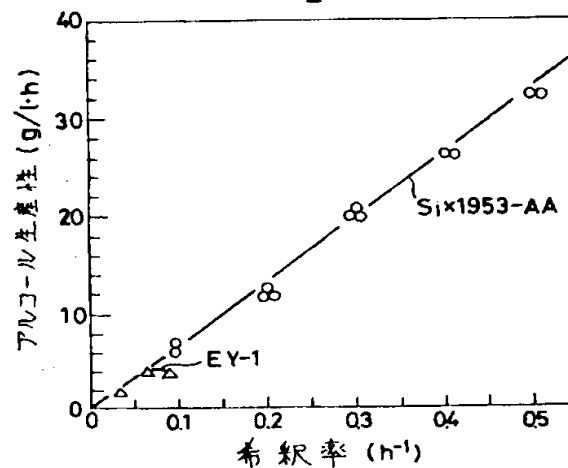
第1図は連続発酵のフローシート、第2図は希釈率とアルコール生産性の関係を示すグラフである。

以上

特許出願人 日立造船株式会社
 代理人 岸本 瑛之助 (外4名)



第1図



第2図